2010年8月 第1版

MORINAGA

研究用試薬

モリナガ
マウスインスリン測定キット
ラットインスリン測定キット

共通取扱説明書

【お願い】
製品をご使用になる前に、
必ずお読みください。

MIoBS 株式会社 森永生科学研究所
横浜市金沢区幸浦2-1-16 〒236-0003
http://www.miobs.com

■ キットの構成

	品　　名	容　量	数量
A	抗体固相化プレート	8ウェルX6本	2パック
B	凍結乾燥インスリン標準品	2ng	1本
C	凍結乾燥モルモット抗インスリン血清	6mL用	2本
D	凍結乾燥酵素標識抗モルモットIgG抗体	6mL用	2本
E	酵素基質溶液（TMB溶液）	13mL	1本
F	反応停止液（1N硫酸）	13mL	1本
G	検体希釈液	30mL	1本
H	20倍濃縮洗浄液（1000mL用）	50mL	1本
	プレート用フレーム		1個
	プレート用ふた		1枚

■ その他必要な器具・装置

1．マイクロピペット
　5μL～1000μLの範囲が必要です。
2．メスシリンダー（1000mL）
3．ポリプロピレン製チューブ（1.5mL）
　標準曲線用インスリン溶液の調製および検体の希釈に使用します。
4．プレートリーダー
　単波長の場合：450nm
　2波長の場合：主波長 450nm・副波長 610～650nm が測定できるもの。

■ キットの特長

1．5μL の検体で測定が可能です。

⚠注意　ピペッティング誤差にご注意ください。

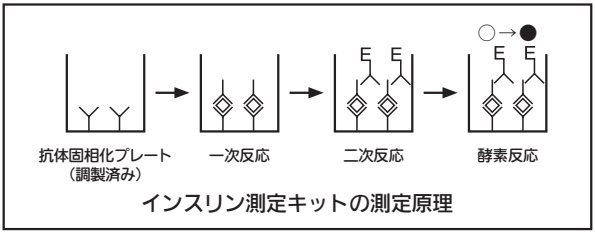
2．マイクロプレートを使用したサンドイッチ ELISA 法であるため特別な施設・設備等を必要とせず、通常の実験室で測定可能です。

■ 測定原理

一次反応：検体中のインスリンがプレート上で、固相化抗インスリンモノクローナル抗体-インスリン-モルモット抗インスリン抗体の複合体を形成する。

二次反応：酵素標識抗モルモット IgG 抗体がモルモット抗インスリン抗体に結合する。

酵素反応：酵素基質溶液を加えると、プレート上の複合体に結合した酵素により呈色する。得られた吸光度に対応するインスリン濃度を標準曲線から算出する。



インスリン測定キットの測定原理

■ 試薬の調製法

・A 抗体固相化プレート

常温に戻してから開封してください。開封後は直ちに使用してください。

・インスリン標準溶液（10ng/mL）

⚠注意　検体の種類および使用量により溶解液が異なります。

血清・血漿検体を測定する場合…… G 検体希釈液

培地等の検体を 5μL で測定する場合

…… G 検体希釈液

培地等の検体を 5μL を超える量で測定する場合

……検体と同一組成の培地等

B 凍結乾燥インスリン標準品に **G 検体希釈液**または培地等を 200μL 加えて溶解してください。10ng/mL インスリン標準溶液となります。溶解後は直ちに使用してください。

・モルモット抗インスリン血清（使用直前に調製）

C 凍結乾燥モルモット抗インスリン血清に **G 検体希釈液**を 6mL 加えて溶解し、溶解後は直ちに使用してください。

・酵素標識抗モルモット IgG 抗体溶液（2 日目使用直前に調製）

D 凍結乾燥酵素標識抗モルモット IgG 抗体に **G 検体希釈液**を 6mL 加えて溶解し、溶解後は直ちに使用してください。

測定の 2 日目に使用するのでご注意ください。

・E 酵素基質溶液

そのまま使用してください。

・F 反応停止液

そのまま使用してください。

・G 検体希釈液

そのまま使用してください。

・洗浄液

H 20 倍濃縮洗浄液を蒸留水またはイオン交換水で 20 倍に希釈し、必要量を調製してください。

■ 測定操作手順

測定は**二重測定以上**をおすすめします。
全ての試薬は常温に戻してから使用してください。

標準曲線用インスリン溶液の調製法

インスリン標準溶液をG検体希釈液または培地で下表に従い希釈し、0ng/mLから10ng/mLの標準曲線用インスリン溶液を調製してください。

インスリン濃度(ng/mL)	10	5	2.5	1.25	0.625	0.313	0.156	0
インスリン標準溶液(μL)	200	50						
検体希釈液または培地等※1(μL)		50	50	50	50	50	50	50
			50	50	50	50	50	
総液量(μL)	200	100	100	100	100	100	100	

※1　**検体の種類および使用量により希釈液が異なります。**
血清・血漿検体を測定する場合 …… G検体希釈液
培地等の検体を5μLで測定する場合…… G検体希釈液
培地等の検体を5μLを超える量で測定する場合
…検体と同一組成の培地等

[1日目]

一次反応：
1. 抗体固相化プレートを常温に戻した後、アルミ袋から取り出し、プレート用フレームにセットします。
2. 各ウェルにモルモット抗インスリン血清（4ページの「試薬の調製法」に従い調製したもの）を95μLずつ分注します。
3. 各ウェルに標準曲線用インスリン溶液または検体を5μLずつ添加します。（一次反応の全液量は100 μL/ウェルとなります）
   ⚠**注意**　ピペッティング容量にばらつきが生じないようにご注意ください。
4. 付属のプレート用ふたをして4℃で一晩（16～20時間）静置して反応させます。

［2 日目］

二次反応：

5. ウェル内の溶液を完全に除去し、各ウェルあたり 300μL の洗浄液（4 ページの「試薬の調製法」に従い調製したもの）で 3 回洗浄します。最後の洗浄でウェル内に残った溶液を完全に除くため、プレートを清潔なペーパータオルなどに押しつけるようにして水分を除いてください。
6. 各ウェルに酵素標識抗モルモット IgG 抗体溶液（4 ページの「試薬の調製法」に従い調製したもの）を 100μL ずつ分注します。
7. プレート用ふたをして常温で 1 時間静置して反応させます。

酵素反応：

8. ウェル内の溶液を完全に除去し、各ウェルあたり 300μL の洗浄液で 5 回洗浄します。最後の洗浄でウェル内に残った溶液を完全に除くため、プレートを清潔なペーパータオルなどに押しつけるようにして水分を除いてください。
9. 各ウェルに E 酵素基質溶液を 100μL ずつ分注します。
10. プレート用ふたをして遮光下常温で正確に 30 分間静置して反応させます。
11. 各ウェルに F 反応停止液を 100μL ずつ分注し酵素反応を停止させます。
12. プレートリーダーで各ウェルの吸光度を測定します。
13. 標準曲線用インスリン溶液の吸光度より標準曲線を作成し、検体中のインスリン濃度を求めます。（濃度の算出法については、8 ページを参照してください）

⚠注意　酵素反応停止後は 30 分以内に吸光度を測定してください。

■ 測定操作手順の概略

測定は二重測定以上をおすすめします。

標準曲線用インスリン溶液、および検体を用意

↓

プレート用フレームに抗体固相化プレートをセット

↓

モルモット抗インスリン血清を 95μL/ウェルで分注

↓

標準曲線用インスリン溶液または検体を 5μL/ウェルで添加

↓

4℃で一晩（16～20 時間）静置して反応

↓

300μL/ウェルの洗浄液で 3 回洗浄

↓

酵素標識抗モルモット IgG 抗体溶液を 100μL/ウェルで分注

↓

常温で 1 時間静置して反応

↓

300μL/ウェルの洗浄液で 5 回洗浄

↓

酵素基質溶液を 100μL/ウェルで分注

↓

遮光下常温で 30 分間静置して反応

↓

反応停止液を 100μL/ウェルで分注

↓

プレートリーダーで450nm（副波長 610～650nm）の
吸光度を 30 分以内に測定

↓

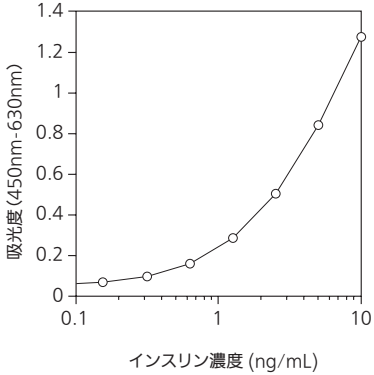
標準曲線用インスリン溶液の吸光度から標準曲線を作成し、
検体中のインスリン濃度を求める

⚠注意　洗浄の際は、ウェル内に反応液や洗浄液を残さないようにしてください。

■ インスリン濃度の算出法

1．各濃度の標準曲線用インスリン溶液および検体について、吸光度の平均値を算出します。
2．片対数方眼紙を用い、横軸（log 側）に標準曲線用インスリン溶液の各インスリン濃度を、縦軸（linear 側）に標準曲線用インスリン溶液のそれぞれの吸光度平均値をプロットし、標準曲線を作成します。
3．標準曲線より各検体中のインスリン濃度を読みとります。
4．検体の吸光度が標準曲線の吸光度範囲を超えた場合は、検体を希釈して再度測定してください。

標準曲線例



■ 検体量を増やして測定したい場合

検体中のインスリン濃度が低すぎるため検体量5μLでは測定値が測定範囲から外れる場合は、検体量を20μLまで増やして測定することが可能です。ただし、特に血清・血漿検体では、検体量を増やすと血液中の蛋白質等の影響が大きくなり、正確なインスリン濃度が得られない場合があります。あらかじめ検体量を増やしても添加回収試験での回収率が十分であることを確認してから実際の測定を行うことをお勧めします。

測定操作手順

本取扱説明書5ページの「一次反応」の「2.」および「3.」、6ページの「酵素反応」の「13.」を次のように変更してください。

[1日目]

一次反応：2. 各ウェルにモルモット抗インスリン血清（4ページの「試薬の調製法」に従い調製したもの）を10ページの表に従い分注します。

3. 標準曲線作成用ウェルに、標準曲線用インスリン溶液5μLと検体希釈液または培地等を10ページの表に従い添加します。
検体測定用ウェルに、検体を10ページの表に従い添加します。
一次反応の総液量は、全てのウェルで100μL/ウェルとなります。

⚠注意　モルモット抗インスリン血清の分注量は標準曲線作成用ウェルと検体測定用ウェルで同じである必要があります。また、検体量を増やすことによりモルモット抗インスリン血清の分注量が通常の95μL/ウェルより少なくなるため、検体量を増すほど標準曲線の吸光度も低下します。

検体量を変えて測定する場合の一次反応液調製例

		モルモット抗インスリン血清	標準曲線用インスリン溶液※1	検体希釈液または培地等※2	検　体	全液量
検体量5μLの場合	標準曲線作成用ウェル	95μL	5μL	−	−	100μL
	検体測定用ウェル	95μL	−	−	5μL	100μL
検体量10μLの場合	標準曲線作成用ウェル	90μL	5μL	5μL		100μL
	検体測定用ウェル	90μL	−	−	10μL	100μL
検体量20μLの場合	標準曲線作成用ウェル	80μL	5μL	15μL		100μL
	検体測定用ウェル	80μL	−	−	20μL	100μL

※1 培地等の検体を5μLを超える量で測定する場合は、4ページの「試薬の調製法：インスリン標準溶液(10ng/mL)」および5ページの「標準曲線用インスリン溶液の調製法」において、検体と同一組成の培地等を用いて調製したインスリン溶液を使用してください。

※2 血清・血漿検体を測定する場合は、検体量にかかわらずG検体希釈液を使用してください。培地等の検体に含まれるインスリンを検体量5μLで測定する場合はG検体希釈液を、また、5μLを超える量で測定する場合は検体と同一組成の培地等をご使用ください。

［2日目］

酵素反応：13. 標準曲線用インスリン溶液の吸光度より標準曲線を作成し、インスリン濃度を求め、次の式に従って検体中の実際のインスリン濃度を計算してください。

$$\text{検体中のインスリン濃度} = \frac{\text{標準曲線より求めた濃度} \times 5}{\text{加えた検体量（μL）}}$$

■ キットの保存条件および有効期限

1. 2～8℃で光の当たらない場所に保管してください。（凍結厳禁）
2. キットは有効期限内に使用してください。有効期限はラベルに記載してあります。
3. 一度開封した試薬は、1週間以内に使用してください。調製後の試薬については、4ページの「試薬の調製法」をご参照ください。

■ 使用上または取り扱い上の注意

1. ロット番号の異なる試薬を組み合わせて使用しないでください。
2. 測定の際は必ず標準曲線用インスリン溶液を同時に測定し、測定の都度標準曲線を作成してください。
3. 反応停止液、酵素基質溶液を取り扱う場合、溶液と接触する部分に金属が使用されていないものを使用してください。
4. 反応停止液は1N硫酸であり、酵素基質溶液は過酸化水素を含むので、これらの試薬の取扱いの際は手や粘膜に付かないようにご注意ください。
5. 試薬が誤って手や粘膜についた場合は、水で十分に洗い流す等の応急処置を行い、必要があれば医師の手当て等を受けてください。
6. 一部の試薬には動物の血清が使用されていますので、取り扱いにご注意ください。

FSC 森林認証紙（SGS-COC-001773）に、ノンVOCインキ（石油系溶剤0%）で印刷しています。
また、読みやすさに配慮したフォントを使用しています。